

醤油製造工程において生成する風味成分等の 網羅的解析による品質寄与因子の解明

— 製造工程における醤油香気の変化 —

食品コスメ部

吉村臣史 澤田和敬 柘植圭介

宮島醤油株式会社

水野裕一

国立大学法人佐賀大学農学部

小林元太

本研究では、醤油の製造工程の中でも重要な工程である醤油諸味の発酵、熟成段階において、品質に大きな影響を及ぼす揮発性成分の生成挙動及び消長について、ノンターゲットによる網羅的解析により評価を行った。今回の結果から、564個のピークを検出することができ、全てのピークに対して主成分分析及び非階層的クラスター分析による統計解析を行ったところ、発酵における管理段階（冷却期、加温期、発酵期）及び熟成期において、関与成分が変化している可能性が示唆された。また、特に熟成期において多くの揮発性成分が影響を及ぼしている傾向が確認され、熟成期における諸味の管理が醤油本来の香りに大きく影響を及ぼしている可能性が示された。

1. はじめに

醤油は古来より個々の家庭に必ず常備されている調味料であり、日本人にとって切り離せない調味料の一つである。世界的にもユネスコの無形文化遺産に登録された「和食：日本人の伝統的な食文化」において、醤油は非常に重要な役割を担っている。

醤油の製造は、伝統的な技法に沿った造りを基本としている。近年においては、納豆等の発酵食品がその機能性について脚光を浴びているが、醤油も発酵食品の一つであり、様々な微生物の力を応用した食品の一つとしてよく知られている。

発酵食品の製造において常に問題となり得るが、微生物の作用を十分に発揮するためには、微生物の特徴や利用する環境（温度や湿度等）の適正な維持が重要である。一方、適切な製造環境の維持、管理は、施設に対する投資を増大させ得る因子となることから、立地している地域の温度や湿度等の環境因子に沿った製造ノウハウに基づき生産活動を行っている醤油蔵も多い。

適切な醤油製造を行う上で、把握すべき重要なポイントとして以下の項目が挙げられる。

- (1) 発酵及び熟成において使用する複数の微生物の増殖パターン（微生物叢）に関して、発酵等の経過に伴う微生物叢の変化を適切に把握す

ること。

- (2) 微生物叢の変化に起因する醤油諸味及び醤油製品の風味を、発酵等の経過において適切に把握し、微生物叢の変化が風味等品質に及ぼす影響を明確化すること。
- (3) 醤油諸味の仕込み開始時期の違いに伴う外的因子（気温等）の影響により、微生物叢の変化及び醤油諸味等の品質変化が受ける影響を明確にすること。

これらの事象を明らかにすることにより、醤油製造における微生物関与メカニズムの解明に繋がり、将来的には製造工程の効率化や新規調味料の製造開発のための基礎データの蓄積等に活用可能と考えている。

食品の風味評価に関しては、食品素材に含まれる成分の含量を直接測定することにより、その対象となった成分の特徴を、食品素材の風味の方向性として反映することが多かった（例えば、〇〇が多く含まれるから「うま味が強い」など）。課題としては、個々の成分が持つ特性と含有量から推察した風味の方向性が、対象の食品素材を代表する風味とは、必ずしもイコールとならないことである。

近年では、味覚を「うま味」や「苦味」等の味言語を指標として、直接それらを測定できる機器が複数販売されている。これらの機器は、センサー工学の観点

から取り組まれており¹³⁾、「うま味」「苦味」「塩味」といった個別の味言語に対して、測定されたセンサー応答値から算出され、客観的な数値が提供される。この方法は、味覚の種類及びその強度について、具体的データを取得することにより、購買者に対する視覚的訴求が可能なデータを提供できることがメリットとなる。弱みとしては、特定のセンサーに応答した成分群に対する反応値を基にしていることから、どの成分が関係しているのかわかりにくいことが挙げられる。

このような機器分析による食品風味の評価は一長一短があり、これまでも多くの研究者において「食品風味の可視化」に取り組まれている³⁾⁻¹⁵⁾。

機器分析は、特定のメカニズムに基づき設計された機器を用いて分析を行うことであり、分析を行うことのできる範囲は非常に広い。水分や糖度、pHといった比較的簡便な項目から、糖であってもクロマトグラフィーに基づく個別の糖含量の測定、といった項目など、測定したい項目にあわせて選択することができる。

このような状況を背景として、近年では食品の風味評価に対して、機器分析を応用したノンターゲット（何を測定するのかを特定せずに分析する考え方）による網羅的解析を行い、風味に直接的に影響を及ぼしている成分の探索、解明に取り組んでいる事例も多い。

本研究では、醤油諸味の発酵、熟成段階における風味寄与成分の把握及び寄与因子の解明を目的に、ノンターゲットによる網羅的解析を試み、醤油製造の一助となる技術の確立を図ることを目的としている。

2. 実験方法

2.1 被験試料

被験試料は、共同研究機関である宮島醤油株式会社より提供された醤油諸味を使用した。詳しくは下記のとおりである。

屋外醤油発酵タンク 306 の醤油諸味を仕込日の4月13日から熟成終了日の8月22日にかけて経時的に500 mL採取した（表1）。採取した醤油諸味をフードプロセッサを用いて均質化後、使用するまで冷凍保存した。

2.2 揮発性成分 (volatile organic compound; VOC) 分析前処理

冷凍状態である被験試料（プラスチック製ボトルに保存している状態）を水浴中で解凍した。解凍後、遠心分離（25,000 xg, 15分間, 4℃）により固液分離を行い、液体試料を得た。

揮発性成分分析では、固液分離後の液体試料 1 mL をサンプリングし、ガスクロマトグラフ質量分析装置

(GC-MS) に接続したオートサンプラー用バイアル（容量 20 mL）に入れ、分析に供するまで室温環境下の専用ユニットに静置した。

2.3 VOC 分析

サンプリング法をベースとし、閉区間（密閉したバイアル）の気相空間に揮発した成分を固相マイクロ抽出 (Solid Phase Microextraction; SPME) により抽出した。使用機器、サンプル処理条件等詳細条件を表2に示した。

分析は、SPME ファイバーに吸着した VOC を GC-MS に供することにより分析を行った。使用機器、分析条件等詳細条件を表3に示した。

2.4 GC-MS データに基づいたピークのアサイン

表1 醤油諸味採取時期及び生物添加時期

採取日	仕込日数	添加微生物	管理段階
4/13	0	—	冷却期
4/15	2	—	
4/22	9	耐塩性乳酸菌	
4/27	14	熟成酵母	
5/6	23	—	加温期
5/11	28	—	
5/18	35	—	
5/24	41	主発酵酵母	発酵期
5/31	48	—	
6/7	55	—	
6/14	62	—	
6/24	72	—	熟成期
7/23	101	—	
8/22	131	—	

表2 醤油諸味由来揮発性成分の SPME 条件

Conditions	Name or value
Apparatus	AOC-5000plus
Incubation temperature	60°C
Preincubation time before VOC sampling	10 min
Extraction time by SPME	30 min
Desorption time on GC injection port	15 min
Agitator speed during VOC sampling	500 rpm
SPME fiber assembly	DVB/CAR/PDMS
Size of SPME fiber	50/30 mm, 23 Ga

GC-MS による測定データに基づいたピークのアサインは、国立研究開発法人理化学研究所がフリーソフトウェアとして配布されている MS-DIAL (4.9.221218) を使用した。MS-DIAL 上では、アサインされたデータについて、複数の分析データ間のアサインピークについて、ピークエリア等を比較できるとともに、csv ファイル等にアウトプットできることから、アウトプットしたデータファイルを以後の統計解析ソフトウェアである R において使用することが可能である。

本研究では、MS-DIAL を用いて、

- ・ GC-MS 分析により検出されたピークについてアサインを行う。
- ・ アサインされたピークについて、全ての GC-MS データから関係するピークのピークエリアを算出する。

表3 醤油諸味由来揮発性成分の分析等条件

Conditions	Name or value
Apparatus	GCMS-TQ8030
Carrier gas	He
Carrier gas control	Constant linear velocity
Linear velocity of Carrier gas	30.0 cm/sec
VOC introduction to GC column	Split introduction
Split ratio	5
Carrier gas pressure (initial value)	21.6 kPa
Carrier gas flow rate (total, initial value)	7.2 mL/min
Column oven temperature (initial)	30°C
Column oven temperature program	Start temperature; 30°C. Temperature program; 5°C/min to 230°C.
Ionization source temperature	200°C
Interface temperature	230°C
Measured <i>m/z</i> region	from 35 to 300
Column	VF-WAXms
Column size	30 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 mm

- ・ 全 GC-MS データにおけるアサインされたピークのピークエリアを csv ファイルとしてアウトプットする。

ことにより、醤油諸味発酵・熟成における時系列な揮発性成分の変化を追跡するためのデータとして活用した。

2.5 統計解析

統計解析は、フリーソフトである R を使用して行った。R を用いて、主成分分析及び階層的クラスタ分析を行い、諸味発酵及び諸味熟成中における揮発性成分の変化を追跡した。

3. 結果及び考察

3.1 醤油諸味から検出された VOC

図1には発酵開始日にサンプリングした醤油諸味から検出した VOC のトータルイオンクロマトグラム (total ion chromatogram; TIC) を、図2には発酵49日目にサンプリングした醤油諸味から検出した VOC の TIC を、図3には発酵開始から102日目にサンプリングした醤油諸味から検出された VOC の TIC を示している。

これらの結果より、諸味の発酵から熟成に至るまでの間に醤油諸味から検出される VOC について、その組成、含量が大きく変化していることが明らかである。そこで、VOC の個別成分に関して、その生成から消失までの消長挙動をより詳細に検討するために、ノンターゲットによる網羅的解析を試みた。

3.2 醤油諸味から検出された VOC に対する主成分分析

MS-DIAL を用いた検出ピークのアサインにより564個のピークをピックアップすることができた。

前述のように、MS-DIAL を用いることにより、アサインされたピークについて、サンプル間のピークエリアの比較等ができることから、評価の対象となる全ての測定データに対して、アサインしたピークのピークエリアを算出した。この各サンプルに対する GC-MS 分析データから算出されたピークエリア (今回の分析では、39回の GC-MS 分析から得られたデータ (13 (被験試料数) × 3 (分析回数))) を集約し、統計解析ソフトウェアである R の解析用データとして使用している。

図4では、醤油諸味から検出された VOC の成分、検出量に基づいて、主成分分析 (principal component analysis; PCA) を行った結果を示している。この結果から、以下の傾向が推察される。

- (1) 諸味発酵における管理段階ごとにおいて、グルー

プ化する傾向が示された。

- ア 冷却期は、第3象限にグループ化されている。
 - イ 加温期は、第2象限にグループ化されている。
 - ウ 発酵期は、第4象限にグループ化されている。
 - エ 熟成期以降は、X軸上から第1象限にかけてグループ化されている。
- (2) Loading plot より、管理段階の進行に伴い、関与成分が変化している可能性が高い。
- (3) Loading plot より、熟成期において多くの VOC が揮発性に強く関与又は新たに生成している

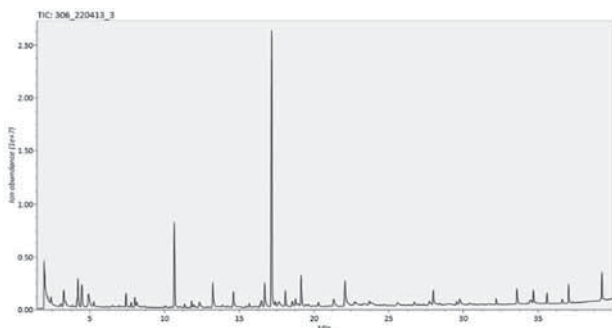


図1 発酵初日の醤油諸味から発生する VOC

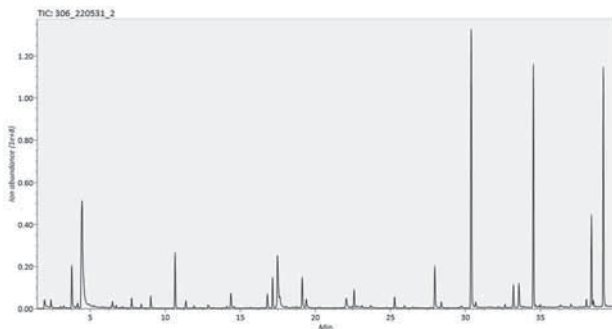


図2 発酵49日目の醤油諸味から発生する VOC

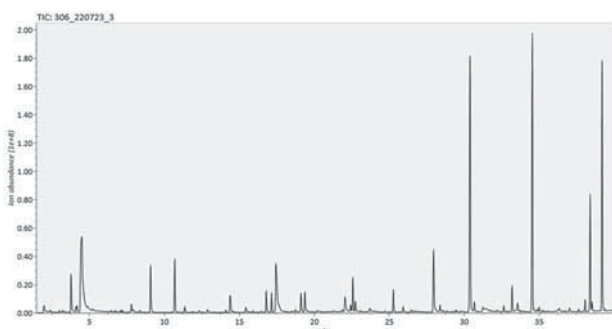


図3 発酵102日目の醤油諸味から発生する VOC

可能性が高い。

3.3 醤油諸味から検出された VOC に対する非階層的クラスタ分析

図5に主成分分析に用いたデータを用いて、非階層的クラスタ分析の結果をヒートマップとして表したものを示している。

この解析では、各ピークの検出量を標準化することにより、ピーク間の検出量の大小よりも個別のピークにおける検出量の変化量を軸として表示している。また、非階層的クラスタ分析の条件として、仕込日数のクラスタ数を4に、検出されたVOCのクラスタ数を6に設定している。

この結果から、仕込日数に関して管理段階ごとにクラスタに分類される傾向が示された。特に冷却期及び加温期、発酵期及び熟成期の2つに大きく分類される傾向であった。

また、成分に関しても、Cluster C1 及び Cluster C2 は主に冷却期及び加温期に検出される VOC が主たる構成成分として確認されている一方、Cluster C3 は加温期以降検出量が増加する成分が主たる構成成分としてクラスタ化されている。

Cluster C4 及び Cluster C5、Cluster C6 において Z-score が高い成分は、冷却期及び加温期ではほとんど検出されておらず、発酵期以降において多く検出されている。これは、PCA の分析と類似した傾向を示しており、Cluster C4 及び Cluster C5、Cluster C6 にクラスタ化された成分が、醤油諸味、ひいては醤油製品の香気に大きく影響を及ぼしている可能性が高いことが推察された。

また、Cluster C6 については、熟成期において検出量が減少している成分が分類されており、これら成分の消長についても今後の検討の材料として注視していきたい。

4. おわりに

今回の結果を踏まえて、他の発酵タンクにおける挙動の調査や仕込の季節における挙動の違いを詳細に検討していく予定としている。

これまで、職人の勘に頼っていた部分を科学的に解明することによって、製造現場から品質管理の広い範囲での応用に繋がる技術として基礎データの蓄積及び関連技術の確立に取り組んでいきたい。

本研究を実施するにあたって、GC-MS/MS 構造解析システムは、電源立地地域対策交付金で導入した機器を使用した。

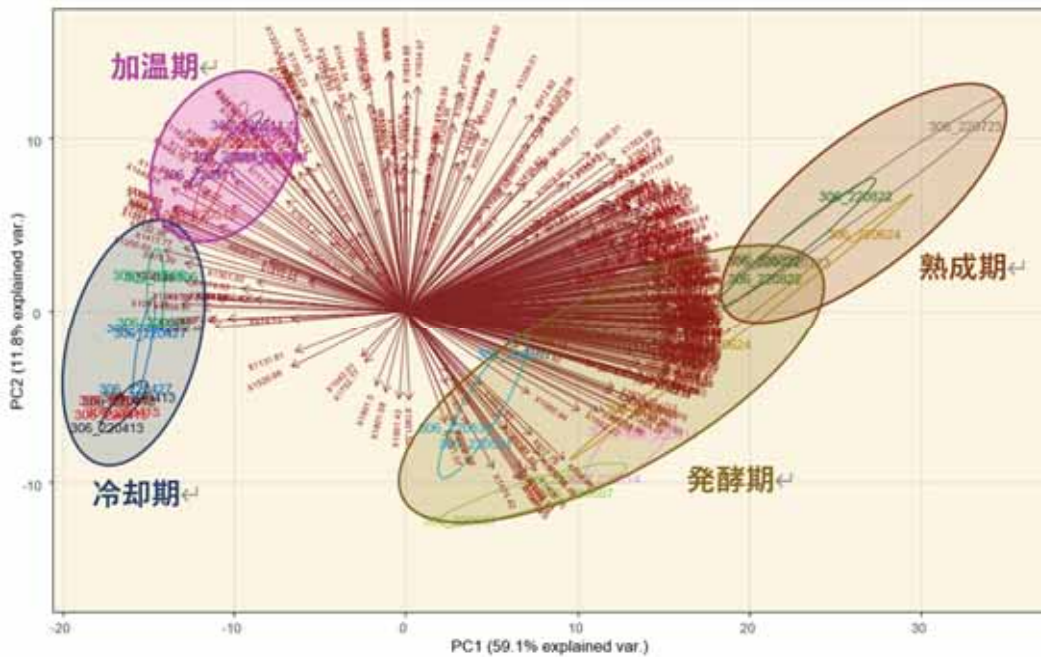


図4 醤油諸味から検出された VOC に基づく主成分分析

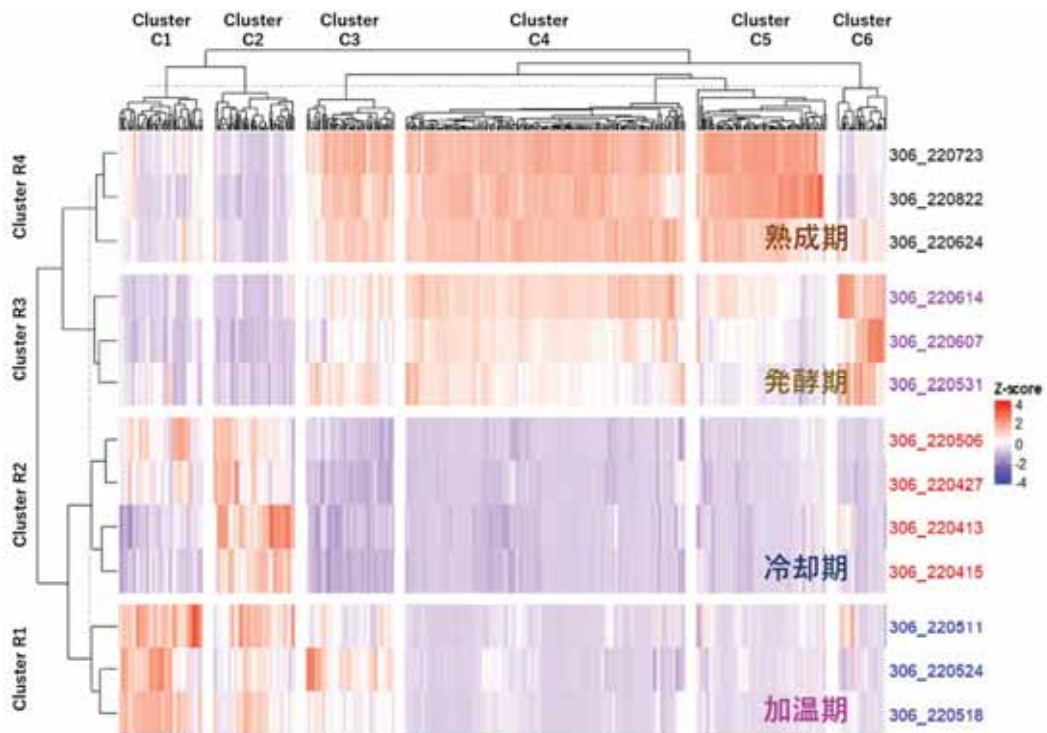


図5 醤油諸味から検出された VOC に基づく非階層的クラスター分析

参考文献

- 1) Hayashi et al., Sens. Actuators, B, 2, 205, 1990.
- 2) Legin et al., Sens. Actuators, B, 65, 232, 2000.
- 3) 小泉幸道ら: 日本食品工業学会誌, 33, 316, 1986.
- 4) 玉野まり子ら: 日本食品工業学会誌, 39, 357, 1992.
- 5) 下田満哉, 箆島豊: 日本調理科学会誌, 34, 236, 2001.
- 6) 今村美穂, 牛尼翔太, 宮田慎吾: 日本調理科学会誌, 52, 67, 2019.

- 7) 武田珠美ら: 日本調理科学会誌, 52, 93, 2019.
 - 8) 中島章裕: 乳業技術, 68, 29, 2018.
 - 9) 菅野洋一郎ら: 電気学会論文誌 E, 140, 294, 2020.
 - 10) 森田亜紀, 早川文代, 香西みどり: 日本食品科学工学会誌, 67, 13, 2020.
 - 11) 森田亜紀, 早川文代: 日本調理科学会誌, 55, 105, 2022.
 - 12) 飯島陽子: 化学と生物, 55, 593, 2017.
 - 13) 飯島陽子: 化学と生物, 58, 210, 2020.
 - 14) Iijima.Y et al.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 80, 2401, 2016.
 - 15) 河原崎正貴: 化学と生物, 55, 538, 2017.
- ※本研究は令和4年度に実施しましたが, 知的財産保護の観点から令和6年度の報告書に掲載しました.